云 南 植 物 研 究 2000，22（2）：175～180
Acta Botanica Yunnanica

激动素在黄瓜子叶器官分化中的作用*

王利琳
（杭州师范学院生物系，浙江 杭州 310036）

梁海曼
（杭州大学生命科学学院，浙江 杭州 310012）

摘要：采用在培养初期分阶段供应激动素（KT）的方法，研究了其对黄瓜子叶器官分化的影响，并对全程供应和不供应 KT 下子叶中内源多胺和内源激素的变化进行了动态测定。结果表明：1）供应 KT 使不定根分化率下降，不影响营养芽的分化，而对于花芽分化则是必需的。2）供应 KT 使多胺中腐胺（Put）含量变化最为显著，在培养第 2、6d 出现峰值，在第 4d 呈低谷，对照则在第 4d 出现峰值。3）供应 KT 使培养 2d 的子叶中吲哚乙酸（IAA）和脱落酸（ABA）含量显著降低，4d 时 IAA 含量显著升高。据上结果，就这些生理变化和花芽分化之间是否存在相关进行了充分讨论。

关键词：激动素；黄瓜子叶；器官分化；多胺；激素
中图分类号：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253－2700（2000）02－0175－06

Effect of Kinetin on the Organ Differentiation in Cucumber Cotyledons

WANG Li－Lin[1]，LIANG Hai－Man[2]
([1] *Hangzhou Teachers College*，Hangzhou 310036)
([2] *College of Life Science*，*Hangzhou University*，Hangzhou 310012)

Abstract：The effect of Kinetin（KT）on organ differentiation in cucumber cotyledons was studied with the provision of KT by stages at the beginning of culture. The results showed that：1）Provision of KT caused a descending rooting，had almost no effect on vegetable bud differentiation，and was utterly essential to the flower bud formation. 2）Provision of KT caused the content of Putrescine（Put）to change greatly. It had two peak values，one occurred on the 2nd day，the other on the 6th day，but on the 4th day its content decreased sharply. 3）Provision of KT caused the contents of IAA and ABA to decrease significantly on the 2nd day and to rise sharply on the 4th day for IAA. Based on these results，we discuss the relationship between these physiological changes and flower differentiation.

Key words：Kinetin；Cucumber cotyledon；Organ differentiation；Polyamines；Endogenous

关于在植物离体培养中，激动素（KT）被用于调控器官发生的报道已有很多。我们在建立离体黄瓜子叶培养物分化花芽的实验系统（ 周菊华等，1992；Pang 等，1993）时，通常要在培养基中添加 2.0 mg/L 的 KT 才能使培养物分化良好，但对于 KT 在黄瓜子叶不定根、营养芽特别是花芽分化中的具体作用却研究较少。我们的工作已经表明，黄瓜子叶在培

* 基金项目：国家自然科学基金资助项目（39400078）
收稿日期：1999－03－11，1999－09－16 接受发表

养初期的0～6 d内就可见不定根发生，花原基和花器官原基的分化（庞基良等，1997；姜维梅等，1998），因此，应特别重视KT在培养初期的供应及其作用。在本文中，我们采用在培养初期分段供应KT的方法研究了其对黄瓜子叶器官分化的影响，并对全程供应KT和不供应KT条件下子叶中内源多胺和内源激素含量的变化进行了动态测定。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为黄瓜（*Cucumis sativus* L.）品种“杭青2号”（HangQing No.2）成熟种子。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗培育 粒选供试品种的饱满种子，吸涨2 h后用0.1% $HgCl_2$消毒5min，无菌水冲洗5次，吸干后接种于MS+3%蔗糖+0.7%琼脂，pH为5.8的培养基上。在25±2℃下暗中培养72 h后，移入每天光照14 h，光照强度为1500 lx条件下育苗。

1.2.2 子叶分化培养 分化培养基为MS+3%蔗糖+0.7%琼脂，添加或不添加2.0 mg/L KT，pH调整到5.8。取7d苗龄子叶（带1～2 mm子叶柄），对半纵向切开，小心去除顶芽，在两种培养基之间做转换试验。试验分两组：一组在供KT培养基上分别培养2d、4d、6d后转入不供KT培养基上继续培养，另一组则在不供KT培养基上分别培养2d、4d、6d后转入供KT培养基上继续培养。以全程供KT和不供KT培养为对照。试验重复1次，每次试验取子叶约50片。培养条件同育苗条件。

1.2.3 多胺的提取和测定 参照马志超等（1991）的方法。取培养0，2，4，6 d的子叶，冰浴浸提纯化后，用Waters 201 高效液相色谱仪（带420 荧光检测器）测定。色谱柱为u－Bondapak NH_2 10μm 3.9×300mm，用1，6－己二胺作内标，流动相为甲苯：氯仿：三乙胺（10∶89∶1），流速为1.2mL/min，荧光检测器Ex=338nm，Em=495nm。

1.2.4 内源激素的提取和测定 按陆军等（1993）的方法。取培养0，2，4，6 d的子叶，低温浸提纯化后，用Shimadzu LC－4A 高效液相色谱仪（带3PD－2AS紫外检测器）测定。测试条件：分析柱Zorbax ODS（250mm×4.6mm I.D.），流动相为甲醇∶乙晴∶水（2∶2∶6，v/v，pH4.0），流速为1.0mL/min，紫外检测（波长254nm），外标法定量。

2 结果与分析

2.1 KT供应时间对器官分化的影响

从表1可以看出：1）供应KT对不定根分化不利，全程供应KT培养使根分化率下降三分之一左右。而KT对于根分化的抑制作用主要发生在子叶培养开始后的1～2 d内。这提示黄瓜子叶培养物不定根发生的启动是在培养初期的1～2 d。2）KT供应与否、供应KT的天数与时期对于营养芽的分化影响不大。这表明黄瓜子叶培养物分化营养芽 时不需要外源KT的供应，外源KT供应也不会明显抑制营养芽的发生。3）KT供应与否，对于花芽分化有显著影响。全程供KT培养，花芽分化率达30%，在1～6 d期间供应KT的，花芽分化率也可达22.5%。表明外源KT对黄瓜子叶花芽分化的诱导主要发生在培养初期的几天内。从不供KT的处理结果看，培养开始后的1～2 d不供KT，花芽分化率即由30%降为7.5%，1～4 d不供KT降为5.0%，1～6 d不供KT，则降为零。表明在子叶培养初期的1

～6d 内，外源供应 KT 是必要的，结果还提示在这 1～6d 内，KT 的作用有严格的时间性。

表 1　KT 供应时间对器官分化的影响

Table 1　Effect of KT on organ differentiation

处理 Treatment	处理天数 Days of treatment	器官分化（%）（Organ differentiation（%））		
		根 Root	营养芽 Vegetable bud	花芽 Flower bud
＋KT	1～2	82.5	70.0	1.0
	1～4	75.0	62.5	12.5
	1～6	70.0	67.5	22.5
	全程 wholecourse	67.5	67.5	30.0
－KT	1～2	90.0	70.0	7.5
	1～4	100.0	77.5	5.0
	1～6	100.0	75.0	0
	全程 wholecourse	100.0	80.0	0

表中数据为两次试验的平均值，培养 35d 时统计。

The data in this table are the average values of two experiments，which were recorded when cotyledons were cultured for 35 days.

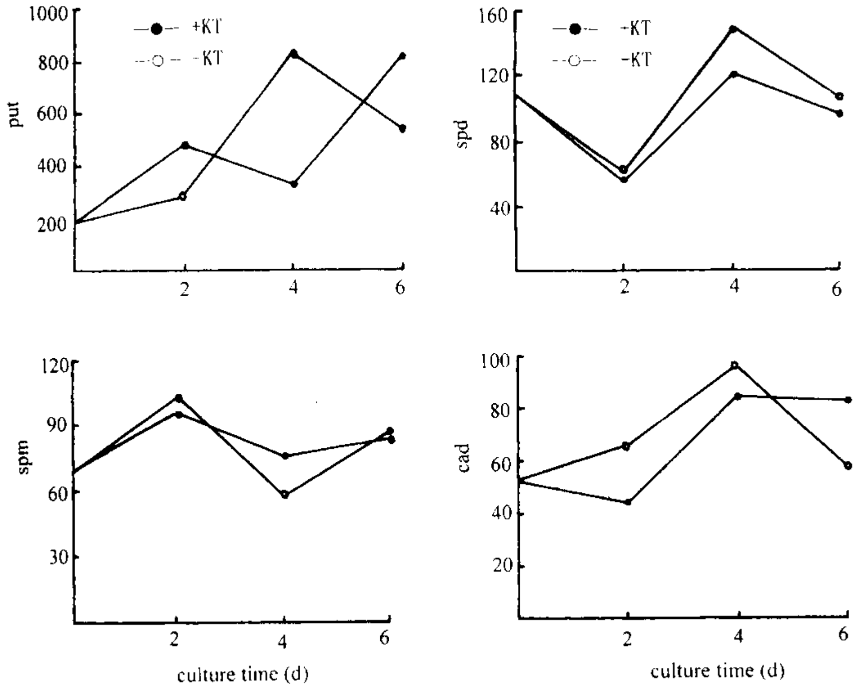

图 1　KT 对黄瓜子叶内源多胺的影响（单位：nmol.g^{-1}FW）

Fig.1　Effect of KT on changes of contents of Polyamines in cucumber cotyledons（unit：nmol.g^{-1}FW）

以上事实表明：对于黄瓜子叶培养物器官分化而言，外源供应 KT 不利于不定根分化，不影响营养芽分化，对于花芽分化则属必要，且 KT 对花芽分化的促进作用发生在子叶培养的 1～6 d 期间。

2.2　KT 对黄瓜子叶内源多胺的影响

从表 1 可知，KT 对于不定根、营养芽分化有一定影响，而对于花芽分化有显著影响，如全程供 KT 花芽分化率达 30%，全程不供 KT 则为零。为了寻找 KT 能促进花芽分化的原因，我们对全程供 KT 和全程不供 KT 下子叶培养初期内源多胺含量变化进行了动态测定，结果如图 1。

从图 1 可以看出：培养 1～6 d 期间，供 KT 和不供 KT 情况下，Spm 和 Cad 含量变幅都比较小；Spd 含量变幅虽比较大，但变化趋势两者基本相同；而 Put 的含量变幅不仅很大，而且供 KT 不供 KT 下 Put 含量变化的节奏也有显著差异，供 KT 的在第 2d 和第 6d 时出现峰值，不供 KT 的在第 4d 时出现峰值。这一变化在 Put／（Spm + Spd）比值上也能得到反映。

2.3　KT 对黄瓜子叶内源激素的影响

全程供 KT 和全程不供 KT 下黄瓜子叶在培养初期内源激素的变化见图 2。

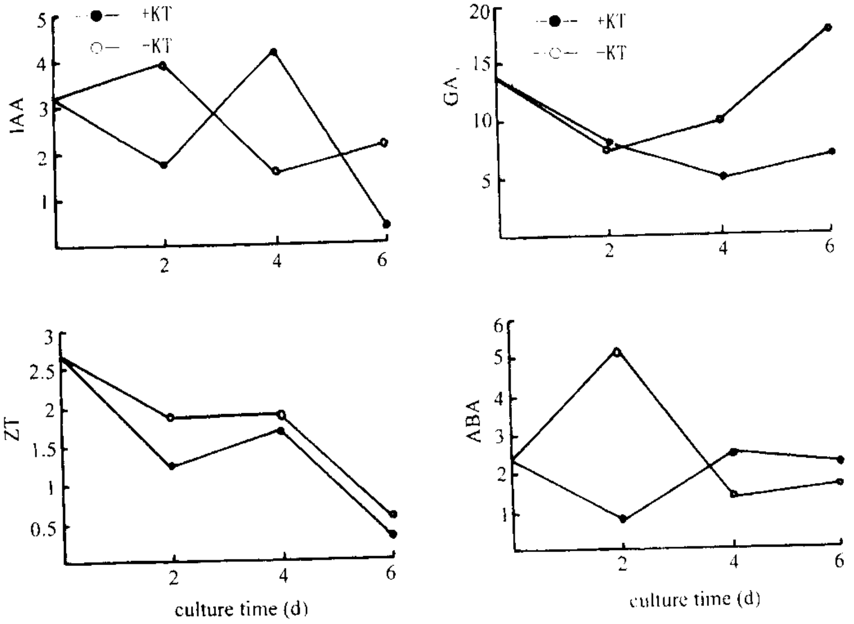

图 2　KT 对黄瓜子叶内源激素的影响（单位：$\mu g.g^{-1}FW$）

Fig.2　Effect of KT on changes of endogenous contents of cucumber cotyledons（unit：$\mu g.g^{-1}FW$）

由图 2 可知：1）培养 1～6 d 期间，KT 供应与否并不明显影响子叶内 ZT 含量，说明子叶离体初期内源 ZT 水平对成花可能无多大影响。2）子叶离体培养 4d 起，GA_3 含量呈上升趋势，供应 KT 则抑制 GA_3 含量上升。3）KT 供应与否，对子叶中 IAA 和 ABA 含量的变化影响最大。供 KT 使 IAA 含量在培养 2、4、6d 时与不供 KT 的呈明显相反趋势，使 6d 时的 IAA 含量明显低于子叶离体时的水平。与不供 KT 相比，供 KT 抑制 ABA 含量在培养 2d 时出现峰值。

以上事实表明，在子叶离体培养初期，KT 供应主要影响了内源多胺中的 Put 水平；对

于子叶中内源激素含量，影响最大的是 IAA，其次是 ABA，GA3 又次之，对 ZT 则基本无影响。由于表 1 所示 KT 供应 6d 花芽分化率即达全程供 KT 的 75%，因此，KT 供应对内源 Put 及内源 IAA、ABA 含量的影响和花芽分化之间是否存在某种相关是值得讨论的。

3　讨论

离体成花研究中使用较多而有效的细胞分裂素为 BA 和 KT。一些报告（Van，1984；Jumin，1987）表明，外植体进行成花培养时，仅需在培养初期供给细胞分裂素即可。本文 KT 供应 2d 即使黄瓜子叶培养物成花，供应 6d 则成花率接近顶点（表 1）。这一结果与上述诸报告是一致的。

一些报告认为多胺参与成花的早期控制，Dai 等（1987）、Torrigiani 等（1987）和 Fouche 等（1997）都认为，多胺中的 Put 在花分化启动前后通常会出现剧烈波动，表现为出现两次峰值，中间可能还会出现一次低谷。本文中 KT 供应导致内源 Put 含量水平的显著波动，以及在第 2、6d 出现两次峰值，在第 4d 出现低谷（无 KT 培养仅在第 4d 出现一次峰值），对于黄瓜子叶培养物成花应该是有意义的。

本文中 KT 对黄瓜子叶中内源激素含量水平影响显著的为 IAA 和 ABA。IAA 和成花关系的报告多而分歧。比较多的报告（Fouche 等，1997；Smulders 等，1988；Odon 等，1989）认为，IAA 参与花启动和花分化发育，但不同阶段的 IAA 适宜水平是不同的，通常在花启动初要求 IAA 处于较低水平。因此，本文中 KT 供应下 IAA 含量水平的波动，以及培养 2d 时的低谷，应该认为是 KT 处理所导致的有利于花启动、分化发育的变化。ABA 对成花影响的报告大体比较一致，认为花启动阶段要求较低的内源 ABA 水平（阮勇凌等，1991；Takeno 等，1996）。本文中 KT 供应导致 ABA 在第 2d 显著低于不供 KT 的对照，而后稍有升高，对于子叶培养物成花也是有意义的。

本文培养试验结果表明，在培养初期的 1～6d 期间 KT 的供应对培养物成花有其特殊重要性。分析结果表明，KT 供应使培养 2d 的 子叶内源 IAA、ABA 水平显著降低和 Put 水平升高，使培养 4d 的子叶内源 IAA 水平显著升高、Put 水平显著降低。我们关于黄瓜子叶培养物花芽形成过程的观察表明，培养 2～3d 可见花原基形成，4～5d 可见花萼原基形成（姜维梅等，1998）。我们关于黄瓜去顶苗直接成花的形态学研究表明，去顶后 2d 可见原基突起，4d 可见 2 次突起（庞基良等，1997），花转变临界期约在去顶后的 3～4d（庞基良等，1999）。将分析结果和形态研究结果、花转变临界期的研究结果联系起来，可以认为 KT 供应导致的第 2d 内源 IAA、ABA 水平下降和 Put 水平升高有利于花分化启动，有利于原基形成，KT 供应导致的第 4d 内源 IAA 水平升高和 Put 水平下降则可能有利于花器官原基分化形成。

参 考 文 献

马志超，藏荣春，储可铭，1991．高效液相色谱法测定番茄愈伤组织中的多胺〔J〕．分析化学，**19**（11）：1317～1319

阮勇凌，张上隆，储可铭等，1991．温州蜜柑花芽分化期枝内 CTK 类型和脱落酸含量及其变化〔J〕．中国农业科学，**24**（1）：55～59

陆军，傅远志，符忠梅等，1993. **水杉在花芽分化期内源激素含量的变化**〔J〕. **植物生理学通讯**，**29**（1）：20～22

庞基良，杨霞，梁海曼等，1997. **黄瓜去顶苗直接成花的形态学研究**〔J〕. **实验生物学报**，**30**（2）：123～131

庞基良，张和珠，梁海曼，1999. **黄瓜去顶苗花决定临界期的研究**〔J〕. **植物生理学报**，**25**（1）：194～198

周菊华，马月珍，罗紫娟等，1992. **离体黄瓜子叶直接开花的研究**〔J〕. **科学通报**，**37**（20）：1905～1908

姜维梅，杜勤，梁海曼等，1998. **黄瓜子叶培养物花芽形成过程的观察**〔J〕. **云南植物研究**，**20**（1）：76～80

Dai Y R，Wang J. 1987. Relation of polyamine titer to photoperiodic induction flowering in *Pharbitis nil* 〔J〕. *Plant Sci*，**51**（2～3）：135～139

Fouche J G，Jouve L，Hausman J F *et al*，1997. Are temperature－induced early changes in auxin and polyamine levels related to flowering in *Phalaenopsis* 〔J〕?*J Plant Physiol*，**150**（1/2）：232～234

Jumin H B，Nito N，1996. *In vitro* flowering of Fortunella hindsii（champ）〔J〕. *Plant Cell Rept*，**15**（7）：484～489

Odon P C，Heide O M，1989. Quantification of gibberellins and indole－3－acetic acid in begonia leaves：relationship with environment，regeneration and flowering 〔J〕. *Physiol Plant*，**76**（4）：500～506

Pang J L，Liang H M，Liu F Y *et al*，1993. Direct formation of male and female flowers from excised cotyledons of cucumber（*Cucumis sativus* L.）〔J〕. *Chinese J Bot*，**5**（2）：185～188

Smulders M J M，Croes A F，Barendse G W M *et al*，1988. Relevance of uptake，transport and conjugation of NAA for the extent of NAA－induced flower bud formation in tobacco explant 〔C〕. 13th Int Confer Plant Growth Substances，25，49

Takeno K，Maeda T，1996. Abscisic acid both promotes and inhibits photoperiodic flowering of *Pharbitis nil* 〔J〕. *Physiol Plant*，**98**（3）：467～470

Torrigiani P，Altamura M M，Pasque G *et al*，1987. Free and conjugated polyamines during denovo floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco 〔J〕. *Physiol Plant*，**70**（3）：453～460

Van den Ende G，Groes A F，Kemp A *et al*，1984. Floral morphogenesis in thin layer tissue cultures of *Nicotiana tabacum* 〔J〕. *Physiol Plant*，**62**（1）：83～88